

(19)대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2006년07월19일
<i>C08B 37/00</i> (2006.01)	(11) 등록번호	10-0602841
<i>A61K 31/715</i> (2006.01)	(24) 등록일자	2006년07월12일

(21) 출원번호	10-2005-0016451	(65) 공개번호
(22) 출원일자	2005년02월28일	(43) 공개일자

(73) 특허권자	고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자	김경현 서울 성북구 안암동 5-1 고려대학교 생명정보공학과 이지혜 서울 성북구 안암동 5-1 고려대학교 생명공학원 류의경 서울 성북구 안암동 5-1 고려대학교 생명공학원
(74) 대리인	윤여강

(56) 선행기술조사문헌	
JP05139972 A	JP2002068992 A
KR1020010019384 A	KR1020040003200 A
US4913909 B	
* 심사관에 의하여 인용된 문헌	

심사관 : 김란

(54) 헬리코박터 파이로리의 세포결합 저해활성을 갖는 녹차에서분리된 산성 다당체와 이를 함유하는 소화성 질환 예방 및치료용 조성물

요약

본 발명은 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*; 이하 헬리코박터)의 숙주세포 결합을 저해하는 산성 다당체(acidic polysaccharide)와 그 제조방법에 관한 것이다. 녹차(*Camellia sinensis*)의 수용성 추출물에서 분리된 산성 다당체는 헬리코박터에 의한 적혈구 응집반응(hemagglutination)을 저해하는 활성이 기존에 보고된 다른 다당체에 비하여 상대적으로 높다. 분리된 다당체는 헬리코박터에 의하여 야기되는 소화성 질환 예방 및 치료제로 사용될 수 있다.

대표도

도 1

색인어

산성 다당체, 녹차, 헬리코박터 파이로리, 위장병, 적혈구 응집반응

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 녹차로부터 본 발명 산성 다당체의 분리 및 정제과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명 산성 다당체의 이온교환 및 젤 여과 크로마토그래피 유출 크로마토그램 프로필을 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명 산성 다당체의 구성당 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명 산성 다당체의 저해활성을 나타낸 것이다. 헬리코박터에 의한 적혈구 응집반응을 0.1-1.0 mg/ml 농도범위에 따라 저해하는 활성을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명 산성 다당체가 대장균(*Escherichia coli*)과 유산균(*Lactobacillus acidophillus*)에 의한 응집반응에는 저해활성이 없음을 보여줌으로써, 헬리코박터에 특이적임을 나타내는 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 현재 소화성 질환 발병 원인균으로 인정되고 있는 헬리코박터의 위 점막 상피세포 결합을 저해하는 산성 다당체, 그리고 산성 다당체를 녹차에서 추출, 분리하는 제조방법에 관한 것이다.

헬리코박터는 그램음성(Gram-negative) 박테리아로서 인체에 만성, 급성위염, 위궤양, 저위도 점막연관 림프 조직형 위림프종, 위암 등을 유발하는 병원체이다(1-2). 산업사회의 경우 60세 이상 인구 중 과반수 이상이 감염되어 있으며, 개발도상국가에서는 대부분의 인구가 유년기부터 감염되는 것으로 보고 되어 있다. 한국에서도 성인의 60% 이상이 감염되어 있고(3), 2살부터 8살 사이 유아의 경우 약 10%가 매년 감염되기 때문에 10대 청소년이 되면 거의 대부분 감염되는 추세를 보이고 있다. 이전에는 위염, 위궤양과 같은 소화성 질환이 일차적으로 위산과다와 같은 과량의 위산 분비에 기인하며, 원인으로 스트레스, 식품 및 유전적 요인 등에 의하여 염증이 생긴다고 알려져 왔지만, 최근 헬리코박터에 의하여 감염되었을 때 염증이 발생한다는 것이 정설로 되어 있다(4-6). 염증이 위 점막하층까지 퍼지게 되면 위궤양으로 발전하게 되고, 위암으로 바로 진행되는 것은 아니지만, 헬리코박터에 감염되면 위암으로 진행될 가능성이 3-5배 정도 높아지는 것으로 알려지고 있다. 헬리코박터의 약 90% 이상은 다른 병원균이 생존하기 어려운 강산성인 위 점액층에 존재하며, 약 10%가 위 상피세포와 부착하고 있다(7,8). 헬리코박터가 부착된 위 상피세포에서는 microvilli의 소실, 액틴 미세섬유(actin filament)의 재배열, 접착발 형성(pedestal formation), 세포막 융합(membrane fusion) 등의 형태적 변화가 일어난다(9).

헬리코박터는 위 점막 상피세포에 결합하는데, 결합 기작이 주로 탄수화물과 이를 인식하는 박테리아 표면 단백질간의 상호작용에 의존하는 것으로 보고되고 있다. 특히 인식 탄수화물로는 뮤신(mucin) 당단백질의 황산화당(sulfated carbohydrate), 사이알릴 락토스(sialyllactose), 퓨코실 루이스 비 항원(fucosylated Lewis b antigen) 등이 보고 되어 있다(10-13). 최근에는 글라이코 스펅고리피드(glycosphingolipid)나 침 속에 있는 뮤신 단백질을 이용하여 박테리아의 세포결합을 저해하려는 노력이 경주되고 있다. 이미 박테리아 표면 단백질 수용체(adhesin)의 분리와 동정이 이루어져 있고, 인식 탄수화물을 이용한 당배합체의 개발은 매우 중요한 발명대상에 속한다. 세포-세포 인식작용에 이용되어온 적혈구 세포의 표면은 위 점막 상피세포와 같거나 비슷한 탄수화물 조성을 보유하고 있으며 헬리코박터와 결합함으로써 응집반응을 일으킨다. 대부분 박테리아 세포는 응집반응을 보이는데, 이는 박테리아 표면에 존재하는 결합단백질이 적혈구와 같은 숙주세포 표면의 탄수화물을 인식함으로써 일어나는 반응이다. 그러므로 상기 상호작용에 의한 결합을 저해하면 헬리코박터에 의해 유발되는 위장병 치료 및 예방이 가능하게 될 것이다. 위 점막 내 상피세포의 탄수화물과 적혈구의 탄수화물이 동일하거나 유사하므로, 적혈구와 헬리코박터의 응집반응을 저해하는 물질은 위 상피세포와 헬리코박터의 결합도 저해되는 물질이므로 이를 위장병(달리 말하면, 소화성 질환) 치료 및 예방에 이용할 수 있는 것이다(14).

기존의 항생제나 화학약품을 이용하면 부작용뿐만 아니라 개발기술이 세포 파괴적인 반면, 인체세포 표면의 탄수화물 인식 및 상호작용을 저해하는 물질은 세포-세포 결합을 저해하여 병원체를 인체 세포 밖으로 유출시켜 염증을 최소화하는 비 파괴적 기술이라는 점에서 중요한 의미를 갖고 있다. 따라서 인체세포의 인식 혹은 부착을 저해하는 탄수화물의 개발은 21세기 친환경적 기능성 물질을 창출할 것으로 판단된다. 이러한 비 파괴적 기술이 적용되는 대표적인 예로 모유나 구강 내 침을 들 수 있다. 침에 풍부히 들어있는 사이알릭 락토스는 이미 구강 병원균의 부착과 번식을 막아주는 역할을 하고 있다(15). 즉, 본 발명은 헬리코박터의 위장 내 부착, 증식 및 활동을 저해하는 생리활성 물질을 천연자원에서 탐색하여 분리한 기술로서, 특히 생명공학 분야에서 새롭게 인식되고 있는 탄수화물 공학적 연구방법을 이용하는 분야이다.

소화성 질환 치료를 위하여 제산제(antacid), 히스타민 수용체의 길항작용제 등이 사용되어 왔지만, 미국 국립보건원은 90년대 중반이후 헬리코박터와 소화성 질환과의 관계를 인정하여 테트라사이클린(tetracycline)이나 아목시실린(amoxicillin)과 같은 항생제의 사용을 다른 치료제와 병행하여 사용할 수 있도록 허용하고 있다. 그러나 항생제의 사용에 따른 인체 내 축적, 부작용, 내성을 갖는 박테리아의 출현 때문에 궁극적으로는 소화성 질환을 치료할 수 있는 대체약품의 개발이 요망되고 있다.

녹차(*Camellia. sinensis*)는 식물 분류학상 산차목(Theales), 산차속(*Camellia*)에 속하는 목본성 상록수이다. 녹차는 동아시아에서 음료로 많이 이용하여 왔고, 북아메리카와 유럽에서는 허브 치료로서 사용되어 왔다. 녹차는 항산화, 항염증, 항돌연변이, 심장질환 예방, 항혈관형성, 세포사멸, 비만 예방, 콜레스테롤 강하, 항동맥경화증, 항당뇨, 항균, 항바이러스, 노화방지 등의 약리 작용이 보고 되었다(16-19). 녹차의 다당류는 면역기능, 항방사성, 항혈액응고, 항암, 항 HIV, 혈당강하 작용이 있다고 보고 되었다(20). 현재까지 차 다당류 결합체 (tea polysaccharide conjugate)의 연구는 주로 이러한 활성에 집중되어 왔고, 다당류의 항부착 활성에 대한 연구는 전무한 실정이다. 뿐만 아니라 종래에는 녹차 조추출물 분획으로 생리활성 측정이 이루어져 왔기 때문에, 분획 중에서 어느 특정 성분이 활성을 갖고 있는지에 대한 분자적 수준에서의 연구가 기술적 한계에 부딪혀 왔다. 그러나, 현재 개발되고 있는 탄수화물 공학적 기술을 이용하여 다당체의 분리, 정제, 동정 및 구조적 분석을 이룸으로써 고부가가치 상품으로의 개발이 가능해지고 있다. 헬리코박터가 적혈구 세포와 결합하여 응집반응을 유도하는데, 녹차의 수용성 추출물 중에서 이온교환 수지 및 젤 여과 수지로 분리된 산성 다당체(acidic polysaccharid)가 헬리코박터에 의한 적혈구 응집반응을 억제하며 저해 효과가 기존에 보고된 다른 다당체 분획에 비하여 상대적으로 높은 특징을 갖고 있다.

본 발명은 녹차 생리활성 물질 중에서 산성 다당체를 분리하게 되었고, 생리활성을 측정한 결과, 기존의 다당체 활성농도에 비하여 상대적으로 낮은 농도에서 헬리코박터에 의한 적혈구 응집반응에 강한 저해효과를 보임으로써 소화성 질환 예방 및 치료제로서 높은 가능성이 입증되어, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 헬리코박터에 의한 적혈구 응집반응에 강한 저해효과를 갖는 녹차에서 분리된 산성 다당체와 그 제조방법 및 상기 산성 다당체를 함유하는 소화성 질환 예방 및 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 녹차 잎을 분쇄하여 열수추출한 후 세틸피리디늄 클로라이드(CPC) 처리와 에탄올 침전을 수행하여 얻어진 산성 다당체에 있어서, 상기 에탄올 침전물을 완충용액에 용해, 투석한 후 이온교환 크로마토그래피와 젤여과 크로마토그래피에 의하여 분리된 것을 특징으로 하는 헬리코박터의 세포결합 저해활성이 있는 산성 다당체를 제공한다.

본 발명의 헬리코박터의 세포결합 저해활성으로 인하여, 헬리코박터가 위 점막 상피세포에 결합하여 발생하는 각종 소화성 질환(즉, 위장병), 예컨대 위염, 위궤양, 위암 등의 예방 및 치료에 효과가 있을 것으로 이해된다(14).

본 발명의 산성 다당체에 있어서, 바람직하게는 상기 이온교환 크로마토그래피의 염화나트륨 농도 0.2-0.4 M에서 분리되고, 젤여과 크로마토그래피의 분자량 15-20kDa 크기(Mw)에서 분리되는 것을 특징으로 한다. 상기 수치범위의 분획에서 가장 높은 헬리코박터의 세포결합 저해활성을 나타내었다.

본 발명의 산성 다당체에 있어서, 그 구성당은 람노스(rhamnose), 아라비노스(arabinose), 갈락토스(galactose), 만노스(mannose) 및 갈락투론산(galacturonic acid)을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 구성당은 본 발명의 실시예에서 박층 크로마토그래피에 의해 확인하였다. 또한, 본 발명의 산성 다당체는 유론산 함량이 높은 것을 특징으로 한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (a) 녹차 잎을 분쇄하고 60-100 °C의 증류수로 추출한 다음 원심분리하여 얻은 상등액에 1~10% 세틸피리디늄 클로라이드(CPC) 용액을 혼합하면서 반응시키고 원심분리한 다음 침전물을 얻는 단계; (b) 상기 (a)단계의 침전물에 5~15% NaCl 용액을 이용하여 남아있는 세틸피리디늄 클로라이드(CPC)를 투석 제거한 다음, 에탄올에 침지하고 원심분리한 후 침전시키는 단계; (c) 상기 (b)단계의 침전물을 최소부피의 10~30 mM Tris 완충용액 (pH 8.0)에 녹여 투석한 후 이온교환 크로마토그래피하여 염화나트륨 0~1 M의 농도기울기로 용출하는 단계; 및 (d) 상기 (c)단계에서 염화나트륨 농도 0.2~0.4 M에서 용출된 산성 분획을 겔여과 크로마토그래피하여 분자량 15~20 kDa 크기(Mw)의 분획을 모으는 단계를 포함하는 녹차 유래의 산성 다당체의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 산성 다당체를 유효성분으로 함유하는 소화성 질환, 예컨대 위염, 위궤양 또는 위암의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 산성 다당체를 사용하는 것을 특징으로 하는 인간을 제외한 포유류의 소화성 질환 치료방법을 제공한다.

본 발명의 산성 다당체는 상기와 같은 예방 및 치료용 조성물로 이용되기 위해서는 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의해 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한 이들은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다.

본 발명에 따른 산성 다당체를 유효성분으로서 투여하는 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 질병의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 100-500mg의 산성 다당체 추출물 및 그 분말로 투여될 수 있다.

이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

본 발명은 소화성 질환 주요 병원균인 헬리코박터에 의하여 야기되는 적혈구 응집반응을 저해하는 산성 다당체와 이를 녹차의 수용성 추출물 중에서 이온교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피로 분리하는 제조방법으로 구성되어 있다. 우선, 1) 당배합체의 분리를 위하여 녹차의 일반적인 섭취 및 추출방식에 따라 뜨거운 증류수로 추출한다. 이는 기존의 천연 생리활성 물질 추출을 주로 식품 및 약품에 적용하기 어려운 유기용매를 이용하여 추출하는 방식과는 대조적으로, 생리활성 물질 탐색에 좀 더 실제적인 접근이며 인체 친화적이라고 할 수 있다. 2) 분리된 산성 다당체는 기존에 보고된 인삼, 쑥에서 추출된 산성 다당체의 헬리코박터 인체 위 상피세포 부착 저해활성 보다 더 높은 저해활성을 보유하고 있다. 3) 산성 다당체는 황산화(sulfated) 탄수화물 측정결과 유로닌산의 함량이 높다. 따라서 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 녹차 잎을 뜨거운 증류수로 추출하는 단계와, 최신 탄수화물 공학적 기술을 이용하여 이온교환 및 겔 여과 크로마토그래피로 생리활성 산성 다당체를 분리하는 단계, 그리고 헬리코박터에 의한 적혈구 응집반응을 저해하는 활성측정 단계로 이루어져 있다.

녹차잎 생리활성 물질추출은 주로 유기용매 추출법에 의존하고 있는데, 이는 우리가 녹차를 뜨거운 물에 우려서 섭취하는 것과 대체되는 것이다. 60-100°C의 증류수에 의하여 추출되는 수용성 분획은 녹차의 경우 생리활성 물질 탐색에 좀 더 실제적인 접근이라고 할 수 있다. 헬리코박터가 위 점막 상피세포에 결합하는 기작에 참여하는 다른 탄수화물의 특성을 살펴보면, 사이알릭산(N-acetylneuraminic acid), 글루구론산(glucuronic acid) 등이 있다(21). 즉, 특이당인 사이알릭당, 글루구론산에 특이적임을 알 수 있다. 녹차에서 추출 분리 정제된 산성 다당체의 헬리코박터에 의한 적혈구 응집반응을 저해하는 최소 유효량은 다른 다당체에 비하여 훨씬 낮은 농도 0.1 mg/ml로서 효과적인 저해활성을 보여주고 있다. 더욱이 헬리코박터 결합을 저해하는데 개발되고 있는 기존의 당 유효량이 25 mM 이상 즉, 약 5 mg/ml 이상의 농도라는 점, 인삼과 쑥에서 기존에 개발된 산성 다당체의 저해활성이 각각 0.25 mg/ml, 0.63 mg/ml 라는 점은 녹차에서 정제된 산성 다당체의 저해활성이 상대적으로 높다는 것을 확인할 수 있다. 이에 따라 산성 다당체의 특성을 분자수준에서 연구함으로써 산업적으로 효과적인 당배합체를 개발하고 디자인할 수 있다는 판단이다.

본 발명에 이용된 DEAE-Sepharose CL-6B 이온교환 수지 및 Sephacryl S-200 column은 아마샴-파마시아 바이오텍(Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)에서 구입하였다. 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography)에 이용된 실리카겔(silica gel 60) plate는 머크(Merck, USA)에서 구입하였다.

본 발명에 사용된 효소 펙티네이스(pectinase), 트립신(trypsin), 글루구론산(glucuronic acid), 갈락투론산(galacturonic acid), 람노스(rhamnose), 아라비노스(arabinose), 자일로스(xylose), 포도당(glucose), 갈락토스(galactose) 등은 시그마(Sigma, USA)에서 구입하였다.

본 발명에 이용된 적혈구 응집반응에 필요한 AB, O형 적혈구는 고려대 의대에서 확보하였으며, 항응고제와 트립신 효소 처리와 무처리를 한 다음 이용하였다.

본 발명에 이용된 헬리코박터 박테리아(ATCC33277)는 10% (v/v) fetal bovine serum과 0.2% (v/v) 2,6-di-methyl-cyclodextrin(CD)이 포함되어 있는 brucella broth에서 37℃, 10% CO₂의 공기조성에서 약 2일 동안 배양하여 harvest 하여 액체질소에 보관하여 실험에 이용하였다.

본 발명에 이용된 대장균(BL21(DE3), BL21(DE3)/pLysS)은 Luria-Bertani(LB) 배지에서 항생제 처리 없이 37℃에서 6시간 배양하였으며, 배양된 대장균은 -70℃에 보관하여 실험에 이용하였다. 유산균(ATCC 4356)은 한국 미생물 보존센터(Seoul, Korea)에서 구입하였고 4℃로 보관하며 사용하였다.

본 발명에 이용된 녹차 잎은 시중에서 구입한 것을 이용하였다.

본 발명 산성 다당체는 녹차잎 함유성분의 분리 및 추출에 이용되는 공지의 방법을 단독 또는 적합하게 조합하여 획득할 수 있다.

이하 실시 예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명하지만, 본 발명의 권리범위는 이들 실시 예에만 국한되는 것은 아니다.

실시예 1: 녹차 잎으로부터 산성 다당체의 분리

산성 다당체의 제조방법은 이미 보고된 바와 같이, 건조한 녹차잎을 60-100℃의 증류수로 추출한 후, 에탄올을 가하여 얻은 침전물을 분무 건조하여 추출물을 얻었다(24). 녹차잎 시료로부터 이온교환과 젤 여과 크로마토그래피로 분리되는 전체적인 분리 정제과정을 나타내면 도 1과 같다. 우선, 녹차 추출물을 60-100℃의 증류수로 추출하여, 10,000 g에서 원심 분리한 후 상등액을 얻었다. 이들 상등액을 모아 5% cetylpyridinium chloride(CPC) 용액을 이용하여 3시간 정도 37℃에서 stirring 하면서 침전을 유도하였고, 원심분리 후 침전물을 얻었다. 10% NaCl 용액을 이용하여 남아있는 CPC를 투석 제거한 다음, 7배 부피의 에탄올로 침전시키고, 이를 최소부피의 20 mM Tris 완충용액(pH 8.0)에 녹여 투석 후 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 분리하였다. 산성 다당체는 이 때 0-1 M 염화나트륨 용액 농도기울기를 이용하였으며, 염화나트륨 농도 0.2-0.4 M에서 분리되어 유출됨을 확인하였다. 분리된 다당체는 투석 후 동결 건조한 다음, 젤 여과 크로마토그래피를 이용하여 다당체 크기별로 분리하여 이중 가장 크고 활성이 제일 높은 분획을 얻었다(도 2). 젤 여과 크로마토그래피로 분리된 산성 다당체에서는 단백질이 검출되지 않았으며, dextran 표준 시료와 비교한 결과, 약 15-20 kDa 크기(Mw)인 것을 확인하였다. 또한 비결합성 분획은 주로 중성 다당체로 이루어져 있음을 확인하였고, 결합성 분획에서는 산성 다당체, 특히 활성이 있는 분획임을 확인하였다. 도 2는 DEAE 이온교환 크로마토그래피와 Sephacryl S-200 젤 여과 크로마토그래피를 이용한 녹차 잎 산성 다당체 정제결과를 나타낸 것으로, (A)는 DEAE(diethylaminoethyl) 이온교환 크로마토그래피에서의 녹차 다당체의 유출 크로마토그램이고, (B)는 이온교환 크로마토그래피의 탄수화물, 유론산 측정 크로마토그램이고, (C)는 Sephacryl S-200 젤 여과 크로마토그램이다.

실시예 2: 단백질, 탄수화물 정량 및 구성당 분석

전체 탄수화물, 유론산 및 단백질의 양은 페놀-황산 방법, 카바졸(carbazole), 및 로우리(Lowry) 방법을 각각 포도당, 갈락투론산(galacturonic acid), 글루구론산(glucuronic acid), 소혈청 알부민을 표준으로 사용하여 결정하였다(22, 23). 산성 다당체의 구성당 분석은 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography) 방법을 이용하였다. 우선, 산성 다당체를 2 M trifluoroacetic acid에 녹여 질소 충전, 밀봉 후 100℃ 이상의 온도에서 2시간 이상 가수분해하였다. 가수분해물을 acetonitrile:DW(4:1) 조건에서 전개시킨 후 10% H₂SO₄ 용액 처리 및 가열하여 spot을 detection하였다. 여러 가지 당 표준시료와 비교하여 확인한 결과, 녹차 산성 다당체의 구성당은 rhamnose, arabinose, galactose, mannose 및 galacturonic acid 등이며, citrus pectin의 구성당 조성과의 상응이 유사하였다(도 3). 도 3은 박층 크로마토그래피에 의한 산성 다당체의 구성당 분석결과를 나타낸 것으로, 녹차 산성 다당체의 구성당(Lane 9)을 당 표준시료(Lane 1-8)와 citrus pectin (lane 10)과 비교 확인한 결과이다.

실시예 3: 헬리코박터에 의한 적혈구 응집반응 저해

배양된 헬리코박터를 인산 완충용액으로 물게 만든 후 동량의 적혈구 용액과 혼합하여 실온에서 30분-3시간 약하게 교반하여 반응시켜서 이를 양성 적혈구 응집반응으로 하였다. 분리된 다당체 분획들을 이용하여 응집반응에 대한 저해활성을 위해서, 헬리코박터 용액과 다당체 용액을 혼합하여, 실온에서 반응시킨 다음, 다시 적혈구 용액을 혼합하여 반응시킨 후 응집반응을 현미경을 이용하여 측정하였다.

헬리코박터에 의한 적혈구 응집반응을 저해하는 활성측정 결과, 녹차잎에서 정제된 여러 분획 중에서도 산성 다당체는 0.1 mg/ml의 낮은 농도에서 저해 활성을 나타내었다. 기 보고 된 특이 단당류, 즉 사이알릭산(N-acetylneuraminic acid), 글루루론산(glucuronic acid)은 약 5 mg/ml 이상의 농도, 즉 25 mM 이상의 높은 농도에서 저해활성을 보이고 있다. 기존에 발명 보고된 인삼, 쑥에서 정제된 산성 다당체는 각각 0.25 mg/ml, 0.63 mg/ml의 저해활성을 보이고 있다. 본 발명의 대상인 산성 다당체는 이에 반하여, 상대적으로 높은 활성을 지닌 것을 확인할 수 있다 (도 4). 도 4는 헬리코박터에 의한 적혈구 응집반응 저해활성의 현미경사진(100배 확대)으로서, (A)는 분획 I, (B)는 분획 II로부터 정제된 산성 다당체(0.1-1.0 mg/ml)의 현미경 사진이다. 이들 산성 다당체는 높은 저해활성을 보인다. 음성응집반응(NC): 적혈구만 있을 때의 결과, 양성 응집반응(PC): 적혈구와 헬리코박터가 같이 있을 때의 결과.

실시예 4: 대장균과 유산균에 의한 적혈구 응집반응 저해

배양된 대장균과 유산균을 완충용액으로 물게 만든 후 동량의 적혈구 용액과 혼합하여 실온에서 밤새도록 반응시켜, 이를 양성 적혈구 응집반응으로 하였다. 분리된 다당체 분획들을 이용하여 응집반응에 대한 저해활성을 위해서, 대장균 용액과 당배합체 용액을 혼합하여 실온에서 반응시킨 다음, 다시 적혈구 용액을 혼합하여 반응시킨 후 응집반응을 현미경을 이용하여 측정하였다.

대장균과 유산균에 의한 적혈구 응집반응을 저해하는 활성측정 결과, 녹차 잎에서 정제된 여러 분획 중에서도 산성 다당체는 1.0-2.5 mg/ml의 높은 농도를 이용하였을 경우에도 저해활성을 보이지 않았다 (도 5). 도 5는 대장균과 유산균에 의한 적혈구 응집반응 저해활성의 현미경사진(100배 확대)으로서, 산성 다당체가 (A) 유산균과 (B) 대장균에 의한 응집반응에는 높은 농도(1.0-2.5mg/ml)에서도 저해활성이 없음을 알 수 있다. 따라서 본 발명 대상인 산성 다당체는 헬리코박터 균에 의하여 유도되는 혈구 응집반응에 대해서는 높은 저해작용을 보이는 반면, 대장균이나 유산균에 의한 혈구응집반응에는 아무런 저해효과를 보이지 않음으로써, 헬리코박터 세포부착에 특이적인 활성을 보유하고 있음을 알 수 있었다. 글루루론산의 저해활성이 25 mM 이상에서 보고된 바 있고 (16), 발명 대상인 산성 다당체는 앞서 기술한 바와 같이 기존에 보고된 다른 산성 다당체보다 더 높은 활성을 갖는 특이 다당체로 판단된다. 아직까지 헬리코박터 혈구 응집반응을 저해하는 정제된 다당체에 대하여 연구가 많이 보고된 바가 없다. 따라서, 녹차 잎으로부터 산성 다당체를 분리, 정제하였고, 정제된 산성 다당체를 이용하여 헬리코박터 소화성 질환 원인균에 의한 인체 세포 결합을 저해하는 활성을 확인함으로써 본 발명을 이루게 되었다.

발명의 효과

이상에서 상술한 바와 같이 1) 소화성 질환 발병 원인균인 헬리코박터와 인체 적혈구 세포와의 응집반응을 저해하는 산성 다당체, 2) 녹차 잎의 수용성 추출물 중에서 이온교환과 겔 여과 크로마토그래피로 산성 다당체를 분리하는 제조방법에 대한 발명을 이루었다. 우리나라 성인의 대부분이 소화성 질환을 경험했거나 그 결과 수술로 이어지고, 더 나아가 미리 진단되지 못하여 발생하는 피해가 큰 것으로 사료된다. 본 발명을 통하여 소화성 질환 예방 혹은 치료제 선도물질의 개발 효과를 거두어줄 것으로 판단된다. 특히 기존의 항생제나 화학 의약품의 경우 부작용뿐만 아니라 개발기술이 세포 파괴적인 반면, 숙주세포 표면의 탄수화물 인식 및 상호작용을 저해하는 물질은 세포-세포 부착 및 결합을 저해하여 소화성 질환을 최소화하는 비 파괴적 기술이라는 점에서 매우 중요한 미래지향적인 식품 및 의약품의 의미를 갖고 있다. 뿐만 아니라 향후 인체 내 세균의 침입에 따른 감염을 예방 혹은 치료하는데 당배합체의 친환경적 우수성을 이용함으로써 넓은 시장성 확대가 가능하다고 판단된다. 마지막으로 최근 웰빙 문화의 확산으로 건강에 좋은 녹차의 기능성이 인정되고 있는 이 때에, 새롭게 추출 정제된 산성 다당류의 병원균 부착 저해활성은 또 다른 녹차 기능성의 탁월성을 증명하는 것이라고 판단된다. 녹차 잎으로부터 분리된 산성 다당체는 천연소재로서 부작용을 최소한으로 줄일 수 있는 효과를 갖고 있다. 천연 물질의 상대적 농도에 따른 저해활성의 뛰어난 효과가 있으므로 식품 및 의약 산업에 있어서 매우 뛰어난 발명인 것이다.

[참고문헌]

1) Marshall BJ, Goodwin CS, Warren JR. et al. (1988) Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. Lancet 2, 1437.

- 2) Bernersen, B., Johnsen, R., Bostad, L. et al. (1992) Is *Helicobacter pylori* the cause of dyspepsia? Br. Med. J. 304, 1276.
- 3) 김진호, 김학양, 김나영 등. (2000) 상부위장관 증상이 없는 한국인에서 *Helicobacter pylori* 감염의 혈청학적 유행을에 관한 전국적 역학조사. 대한내과학회지 59: 388-397.
- 4) O'Hanley, P. Infections due to Gram-negative bacilli (1995) Sci. Amer. Med. vol 2, Chapter 7, pp1-43.
- 5) Buck GE. (1990) *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. Clin. Microbiol. Rev. 3, 1-12.
- 6) Van der Linden, B. (1994) *Helicobacter pylori* in gastroduodenal disease. Curr. Opin. Infect. Dis. 7, 577-581.
- 7) Dandon WG, Beesley SM, Smyth CJ. (1998) *Helicobacter pylori* a coundrum of genetic diversity. Microbiol. 144: 2925-2939.
- 8) Censini S, Stein M, Covacci A. (2001) Cellular responses induced after contact with *Helicobacter pylori*. Current Opinion Microbiol. 4: 41-46.
- 9) Chun HJ, Park DK, Park CM, et al. (2002) Electron microscopic evaluation of adhesion of *Helicobacter pylori* to the gastric epithelial cells in chronic gastritis. Kor J Intern Med 17: 45-50.
- 10) Tzouvelekis LS, Mentis AF, Makris M, Spiliadis C, Blackwell C, Weir DM. (1991) In vitro binding of *Helicobacter pylori* to human gastric mucin. Infect Immun 59, 4252-4
- 11) Evans DG, Evans DJr, Moulds JJ, Graham DY. (1988) N-acetylneuraminyllactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. Infect Immun 56, 2896-906
- 12) Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. (1993) Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science 262, 1892-5
- 13) Saitoh T, Natomi H, Zhao WL, Okuzumi K, Sugano K, Iwamori M, Nagai Y. (1991) Identification of glycolipid receptors for *Helicobacter pylori* by TLC-immunostaining. FEBS Lett 282, 385-7
- 14) Belogortseva, N.I., Yoon, J.Y. and Kim, K.H. Inhibition of *Helicobacter pylori* Hemagglutination by Polysaccharide Fractions from Roots of *Panax ginseng*. Planta Medica. (2000) 66, 217-220.
- 15) Yarema, K.J. and Bertozzi, C.R. (1998) Chemical approaches to glycobiology and emerging carbohydrate-based therapeutic agents. Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 49-61.
- 16) Yang, C.S., Wang, Z., (1993) Tea and cance review. J. Natl. Cancer Inst. 85: 1038-49.
- 17) Cao, Y., Cao, R., (1999) Angiogenesis inhibited by drinking tea. Nature. 398: 381-382.
- 18) Yang, T.T.C., Koo, M.W.L. (2000) Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. Atherosclerosis. 148: 6773.
- 19) Zeyuan, D., Bingying, T.X.L., Jinming, H., Yifeng, C. (1998) Effect of green tea and black tea on the blood glucose, the blood triglycerides, and antioxidation in aged rats. J. Agric. Food Chem. 46: 875-878.
- 20) Isiguki, K., Takakuwa, T., & Takeo, T. (1992) Anti-diabetes mellitus effect of water-soluble tea polysaccharide. In Pr^oceedings of international symposium on tea science 1991, Shizuka, Japan. The Organizing Committee of ISTS. p. 240-241.

- 21) Wadstrom T, Ljungh A. (1999) Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity. J. Med. Microbiol. 48: 223-233.
- 22) Chaplin MF. Monosaccharides, 1. Carbohydrate analysis.(1986) In: Chaplin MF, Kennedy JF, editors. Oxford. IRL PRESS. pp. 1-36.
- 23) Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Chem 72: 48-54.
- 24) Lee JH, Park EK, Uhm C, Chung M, Kim KH. (2003) Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharides from *Artemisia capillaris* and *Panax ginseng*. Planta Medica. (2004) 70: 615-619.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

녹차 잎을 분쇄하여 열수추출한 후 세틸피리디늄 클로라이드(CPC) 처리와 에탄올 침전을 수행하여 얻어진 에탄올 침전물을 완충용액에 용해, 투석한 후 이온교환 크로마토그래피와 젤여과 크로마토그래피에 의하여 분리된 것을 특징으로 하는 헬리코박터의 세포결합 저해활성이 있는 산성 다당체.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 이온교환 크로마토그래피의 염화나트륨 농도 0.2-0.4 M에서 분리되고, 젤여과 크로마토그래피의 분자량 15-20kDa 크기(Mw)에서 분리되는 것을 특징으로 하는 산성 다당체.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 그 구성당은 람노스(rhamnose), 아라비노스(arabinose), 갈락토스(galactose), 만노스(mannose) 및 갈락투론산(galacturonic acid)을 포함하는 것을 특징으로 하는 산성 다당체.

청구항 4.

(a) 녹차 잎을 분쇄하고 60-100 °C의 증류수로 추출한 다음 원심분리하여 얻은 상등액에 1~10% 세틸피리디늄 클로라이드(CPC) 용액을 혼합하면서 반응시키고 원심분리한 다음 침전물을 얻는 단계;

(b) 상기 (a)단계의 침전물에 5~15% NaCl 용액을 이용하여 남아있는 세틸피리디늄 클로라이드(CPC)를 투석 제거한 다음, 에탄올에 침지하고 원심분리한 후 침전시키는 단계;

(c) 상기 (b)단계의 침전물을 최소부피의 10~30 mM Tris 완충용액 (pH 8.0)에 녹여 투석한 후 이온교환 크로마토그래피하여 염화나트륨 0~1 M의 농도기울기로 용출하는 단계; 및

(d) 상기 (c)단계에서 염화나트륨 농도 0.2~0.4 M에서 용출된 산성 분획을 젤여과 크로마토그래피하여 분자량 15~20 kDa 크기(Mw)의 분획을 모으는 단계를 포함하는 녹차 유래의 산성 다당체의 제조방법.

청구항 5.

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 산성 다당체를 유효성분으로 함유하는 소화성 질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 6.

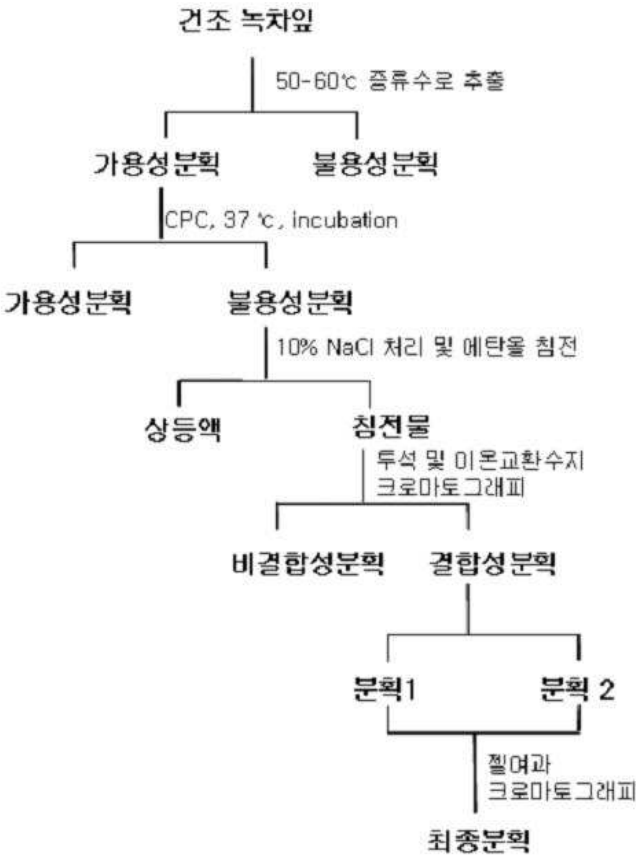
제 5항에 있어서, 상기 소화성 질환은 위염, 위궤양 또는 위암인 것을 특징으로 하는 예방 및 치료용 조성물.

청구항 7.

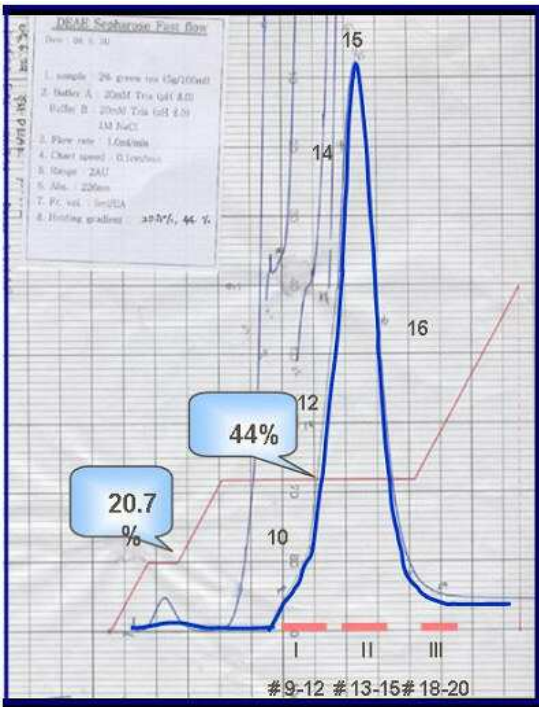
제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 산성 다당체를 사용하는 것을 특징으로 하는 인간을 제외한 포유류의 소화성 질환 치료방법.

도면

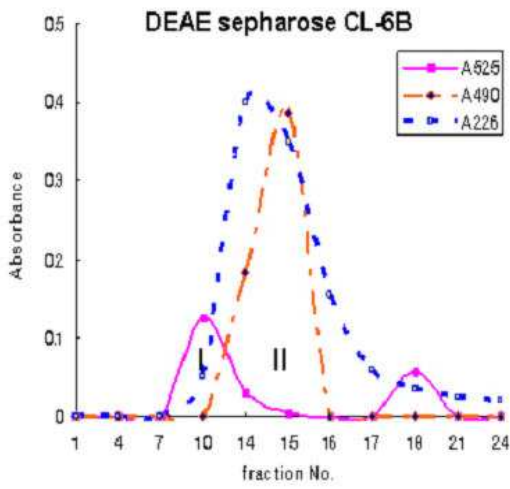
도면1



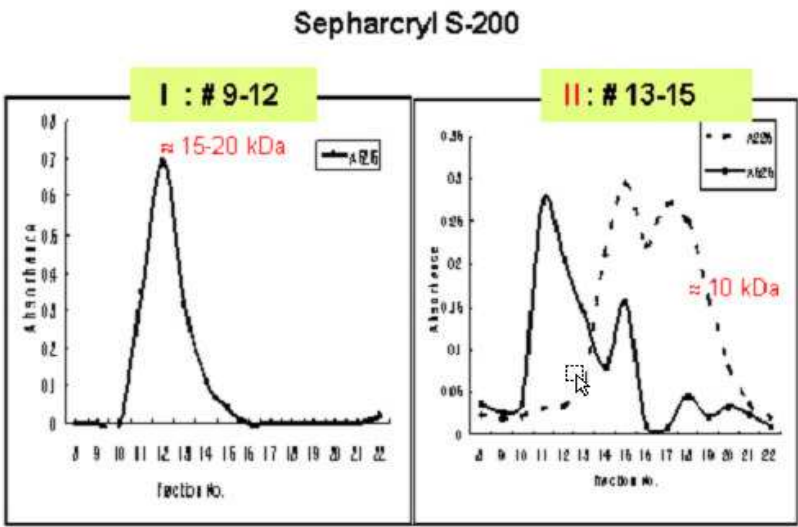
도면2a



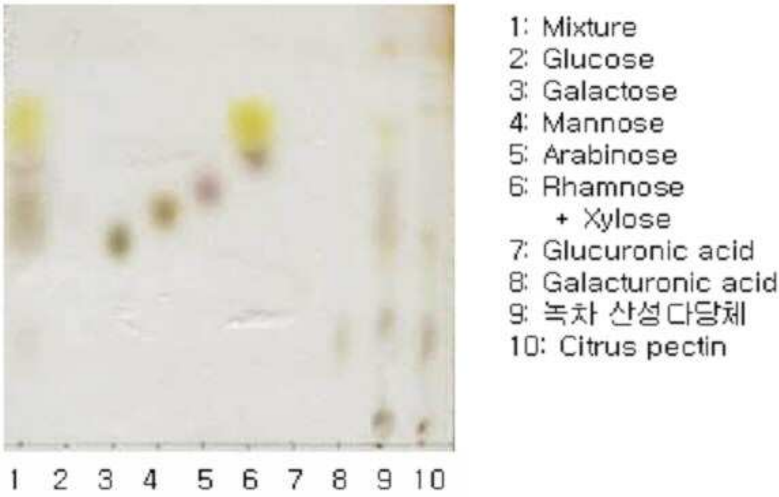
도면2b



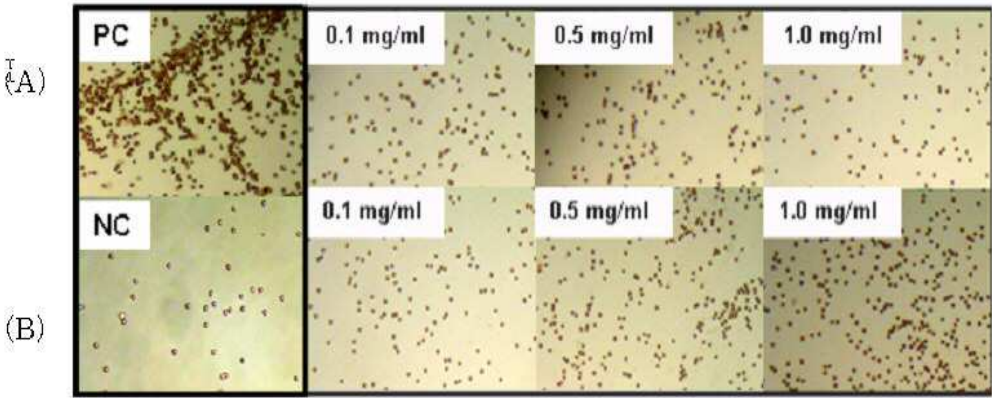
도면2c



도면3



도면4



도면5

